

- For more records, click the Records link at page end.
- To change the format of selected records, select format and click Display Selected.
- To print/save clean copies of selected records from browser click Print/Save Selected.
- To have records sent as hardcopy or via email, click Send Results.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected Free

1. ☐ 14/5/1 DIALOG(R)File 352:Derwent WPI (c) 2005 Thomson Derwent. All rts. reserv.

012016857

WPI Acc No: 1998-433767/199837

XRAM Acc No: C98-131144

Use of low molecular weight chitosan obtained by enzymatic decomposition of chitosan - for prevention and treatment of cerebral stroke, hypertension and hyperlipidaemia

Patent Assignee: SANIN KENSETSU KOGYO KK (SANI-N)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 10182469	A	19980707	JP 96357298	A	19961226	199837 B

Priority Applications (No Type Date): JP 96357298 A 19961226

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 10182469	A	11	A61K-031/73	

Abstract (Basic): JP 10182469 A

Use of low molecular weight chitosan, prepared by decomposition of high molecular weight chitosan or chitin with an enzyme derived from *Enterobacter* sp. G-1 (FERM BP-3140), for prevention and treatment of cerebral stroke is new.

USE - The chitosan prevents and treats cerebral stroke by inhibiting hypertension and preventing hyperlipidaemia

Dwg. 0/8

Title Terms: LOW; MOLECULAR; WEIGHT; CHITOSAN; OBTAIN; ENZYME; DECOMPOSE; CHITOSAN; PREVENT; TREAT; CEREBRAL; STROKE; HYPERTENSIVE; HYPERLIPAEMIA

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-031/73

International Patent Class (Additional): C12P-019/26

File Segment: CPI

Derwent WPI (Dialog® File 352): (c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

<input checked="" type="checkbox"/> Select All			Format
<input checked="" type="checkbox"/> Clear Selections	Print/Save Selected	Send Results	Display Selected Free

© 2005 Dialog, a Thomson business

Best Available Copy

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-182469

(43) 公開日 平成10年(1998) 7月7日

(51) Int.Cl.<sup>8</sup>

A 6 1 K 31/73

// C 1 2 P 19/26

識別記号

ABN

F I

A 6 1 K 31/73

C 1 2 P 19/26

ABN

審査請求 有 請求項の数 3 F D (全 11 頁)

(21) 出願番号 特願平8-357298

(22) 出願日 平成8年(1996)12月26日

(71) 出願人 000177704

山陰建設工業株式会社

島根県出雲市神西沖町2334番地3

(72) 発明者 小村 洋司

島根県出雲市神西沖町2334番地3 山陰建設工業株式会社内

(72) 発明者 堀江 貞樹

島根県出雲市神西沖町2334番地3 山陰建設工業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 河野 誠

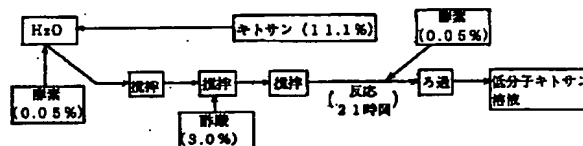
(54) 【発明の名称】 脳卒中予防用又は治療用薬剤

(57) 【要約】

【課題】 脳卒中予防用又は治療用薬剤を提供する。

【解決手段】 キトサンを主成分とした脳卒中予防用又は治療用薬剤であって、主成分が高分子キトサンを分解酵素により低分子化した低分子キトサン溶液であり、さらにキチンを微生物であるエンテロバクター・G-1

(微工研条寄第3140号として寄託済) に由来する分解酵素によりキチンを分解処理して得たものである。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 キトサンを主成分とした脳卒中予防用又は治療用薬剤。

【請求項2】 主成分が高分子キトサンを分解酵素により低分子化した低分子キトサン溶液である請求項1の脳卒中予防用又は治療用薬剤。

【請求項3】 キチンを微生物であるエンテロバクター・G-1（微工研条寄第3140号として寄託済）に由来する分解酵素によりキチンを分解処理して得たものである請求項2の脳卒中予防用又は治療用薬剤。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】この発明はヒトの脳卒中予防用又は治療用薬剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】成人病のうち脳卒中は高いウエイトを占め、死亡率も高く後遺症も大きいが、治療はその原病と考えられている高血圧や動脈硬化に対する予防や治療が主体で、薬物療法では一般に高調ブドウ糖液やアミノフィリン等が用いられるものの、いずれも対症的に用いられるに過ぎず、有効な治療薬や予防薬が存在しないのが実状である。

【0003】一方、キトサンは主にカニやエビ等甲殻類の殻に含まれるキチンを脱アセチル化反応によって抽出したグルコサミンの巨大ポリマーであり、動物性食物繊維である。キトサンは当初、高分子凝集材として工業用廃水処理等に利用されてきたが、近年キトサン研究が進み、植物の生長促進剤、植物病原性カビの抑制剤、食品の防腐剤が開発され、さらに化粧品、衣料、機能性食品等広い分野でその利用が大変注目されている。

【0004】特に医学の分野では止血剤、手術用縫合糸や人工皮膚等の医療用に利用されるほか、最高血圧の降圧作用、高脂血症の改善作用、免疫系の賦活作用、制がん作用等を有することが動物実験等で報告されている。

【0005】キトサンには従来より40～45%水酸化ナトリウム溶液を加え80～120℃で脱アセチル処理して抽出した化学処理キトサンがある。これに対し最近、発明者らのグループは脱アセチル処理に細菌を利用した方法を開発した。種菌としてエンテロバクター（*Enterobacter*）G-1（特公平6-60号公報に掲載されており、微工研条寄第3140号にて特定）を使用し、30℃で1週間通気攪拌して調製した微生物処理キトサンである。

【0006】今回発明者等はこの微生物処理キトサンを使って脳卒中易発症性ラット（SHRSP）における血圧の降圧作用、血漿脂質、主要臓器及び寿命への影響を対照ラットと比較検討し、脳卒中易発症性ラットの発病予防又は治療に格別の効果があることを確認することができた。この発明はこれらの結果に基づき、脳卒中の予防又は治療薬を提供せんとするものである。

## 【0007】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決するための本発明薬剤は、キトサンを主成分としたことを特徴としており、また上記主成分が高分子キトサンを分解酵素により低分子化した低分子キトサン溶液であるほか、さらに上記分解酵素は微生物であるエンテロバクター・G-1（微工研条寄第3140号として寄託済）に由来し、本薬剤はこの分解酵素を用いてキチンを分解処理して得たものであることを特徴としている。

## 【0008】

## 【発明の実施の形態】

## I. 実験材料及び方法

本発明では既述のように微生物処理キトサンを使用するが、このキトサンは図1に示すような方法で製造され、高分子キトサン（粉末）を水に対して11.1%添加して攪拌混合し、キトサンを低分子化するための分解酵素（後述）粉末を重量比で約0.05%添加攪拌する。次いで上記混合液にキトサンを溶解させるための加水分解反応促進剤として酢酸（乳酸その他の有機酸でも可）を約3%比で添加攪拌した後、再度上記分解酵素を0.05%位添加して攪拌する。上記混合液を約30%前後で概ね21時間前後反応させてキトサンの低分子化を実現した後、これを濾過してその濾過液から低分子キトサン溶液を得る。また該溶液を脱水して粉末状のキトサンを得ることができ、この粉末状のキトサンに水を加えて低分子キトサン溶液を作ることも可能であり且つこの溶液を上記濾過液と同様に使用することができる。

【0009】上記分解酵素は例えば特公平6-60号公報中に示されるように、本発明者等が発見した微生物エンテロバクター・G-1（微工研条寄第3140号）によってキチンを分解して得られるもので、約90%のキチナーゼ、7～8%のキトサナーゼ、微量のキチン脱アセチラーゼ等からなり、高分子キトサンを低分子化する方法は、従来の塩酸等による化学的薬剤処理に比して危険性がなく且つ環境汚染をもたらず廃液の排出が避けられ、人体その他の生体に対する安全性も高いという利点がある。なお上記方法による高濃度低分子キトサンの成分及び性状は表1に示す通りである。この発明では少なくとも10,000～20,000の分子量のキトサンの使用が可能である。

## 【0010】表1

【0011】供試ラットは1974年に作成発表された脳卒中易発症性高血圧ラット（SHRSP）を船橋農場（千葉）より購入したものの雄を1群6匹の対照群とキトサン群に分け、合計12匹を使用した。飼育条件は室温23±2℃、湿度50±10%、室内照明時間朝8時点灯、夜8時消灯の12時間とした。飼育ラックは夏目製作所製クリーンラック（KN-735B）を用いた。飼育ケージは350×400×180mmステンレス製

10

20

30

40

50

ケージに床敷を用いて、1ケージに3匹収容した。対照群の餌は日本クレア社製の固形飼料（CE-2）で、キトサン群の餌は対照群の餌に微生物処理キトサンを2%添加した固形飼料を用いた。

【0012】実験期間は5週齢から22週齢迄の17週間とした。尚、飲水には水道水に1%食塩を与えた。体重、摂水量、摂餌量、血圧を毎週1回測定し、総コレステロール（T. Ch）、中性脂肪（T. G）は隔週測定した。血圧はウエダ社製小動物非観血式自動血圧計（UR-5000）を用いて尾動脈から測定した。T. Ch、T. Gは京都第一科学社製スポットケム（SP-4410）を用いて尾静脈より採血した血漿を測定した。実験終了時にペントバルビタールナトリウム麻酔下で頸動脈より放血し、直ちに心臓、肝臓、腎臓及び脳重量を測定し、各臓器及び胸大動脈、腹大動脈、腸骨動脈を病理組織学的に検索した。測定値は平均値±標準誤差（S. E）で示し、統計処理はスチューデント（Student）のt検定を用いて平均値の有意差検定を行った。

#### 【0013】II. 実験結果

##### （1）体重の変化及び生存率（図2参照）

実験開始2週目から11週目までキトサン群の体重は対照群に比べ低い傾向が見られたが有意差はなかった。しかし12週目以降は逆に高い傾向を示した。生存率は対照群のラットが10週目で1匹死亡し、14週目で2匹目が、17週目で3匹目が死亡し、生存ラットが半数になったため実験を終了した。図中逆三角形印の数は当該週の合計死亡ラット数を示す。また図中後半における対照群のラットの平均体重の低下は死亡直前の衰弱によるものと解される。

##### 【0014】（2）血圧の変化（図3参照）

対照群の最高血圧は実験開始時（生後5週齢）で約152mmHgであったが、実験の経過に伴い上昇し、14週目で約310mmHgまで上昇した。キトサン群の最高血圧は実験開始1週目より12週目まで7週目以外は対照群の血圧に比べ低い値を示したが、統計的に有意差はみられなかった。13週目以降は僅かに対照群より高い値を示す傾向がみられた。ちなみに図4は他の実験において本実験と同様の微生物処理キトサン添加と無添加の固形飼料を与えた高血圧自然発症ラットの血圧変化の比較であるが、この例では明確にキトサン群のものの降圧効果が顕著である。

##### 【0015】（3）総コレステロール（T. Ch）の変化（図5（A）参照）

12週目までは両群に有意差は認められなかったが、17週目ではキトサン群のT. Ch値は対照群に比べ有意に低い値を示した。

##### 【0016】（4）中性脂肪（T. G）の変化（図5（B）参照）

キトサン群のT. Gは実験期間を通して統計的に有意に

低い値を示した。

##### 【0017】（5）HDL-コレステロール（HDL-Ch）の変化（図5（C）参照）

実験開始10週目までは両群間には差はみられないが、12週目、17週目ではキトサン群のHDL-Ch値が高い傾向を示した。

##### 【0018】（6）LDL-コレステロール（LDL-Ch）の変化（図5（D）参照）

実験期間を通してキトサン群は対照群の値より低い値を示し、特に6週目、10週目、17週目では統計的に有意差がみられた。

##### 【0019】（7）臓器重量

表2に示すように各臓器ともキトサン群、対照群の間に有意の差は認められなかったが、キトサン投与による臓器の肥大化等の副作用が生じない事が確認できた。

##### 【0020】表2

##### 【0021】（8）病理解剖学的、組織学的検査

対照群の死亡した3匹のラットでは中大脳動脈の破綻による脳出血（出血病変＝脳卒中）がみられた（図6矢印部参照）。主要臓器（腎臓、心臓、肝臓）や大脳の病理組織学的検査では全例に高血圧性の細小動脈の血管壁の肥厚が軽度認められ、キトサン群と対照群に有意差は認められなかった。対照群の死亡した3匹のラットでは脳出血による脳梗塞像（図6）のほか、腎臓では細動脈の硝子様硬化（図7細矢印）、糸球体係蹄壁の肥厚（図7太矢印）等典型的な高血圧性腎病変を示していた。大血管の病変としては弾性線維に変化がみられ、図8は胸大動脈の弾性線維染色像である。同図中のキトサン群

（B）では、弾性線維の走行の乱れは軽微で略平行に配列しているのに比べ、対照群（A）の血管中膜には弾性線維の走行の乱れ、変性等がしばしばみられた。

##### 【0022】III. まとめ

以上脳卒中易発病性ラットを用いて2%のキトサン食を投与した群と対照群で体重、生存率、最高血圧、血漿中のコレステロール、中性脂肪、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、主要臓器重量、病理学的変化を比較検討した結果によれば、生存率は実験期間17週間で対照群は6匹中3匹死亡したが、キトサン群は1匹も死亡しなかった。

【0023】一方、キトサンの投与は図4に示す他の高血圧自然発症ラット（SHR）を用いた実験結果と異なり、最高血圧の統計学的に有意差のある降圧作用はみられなかった。このことは脳卒中症のラットに対しては、キトサンは血圧降下作用をもたらさないものの、脳卒中に対してはこれを予防又は治癒させる作用があり、且つ高血圧に対しても一定の耐性を備えた体質を形成せしめることを示している。血漿中のコレステロール値の低下作用もありみられなかったが、中性脂肪の顕著な低下作用がみられた。またHDL-コレステロールの上昇傾向とLDL-コレステロールの減少傾向がみられ、これ

らの項目に対するキトサンの作用は過去の高血圧自然発症ラット（SHR）に対する他の実験結果と同一又は共通した傾向である。

【0024】さらに、病理学的検査ではキトサンの投与は、高血圧による細小動脈の血管壁の病変（血管壁の内膜、中膜の肥厚、弾性線維の変性、断裂等）の進行を抑制していることがわかった。上記実験はキトサンをラットの飼料に混入して経口投与したものであるが、キトサンが既に止血剤、手術縫合糸、人工皮膚等に利用されている実績から、人体に対する安全性が確認されている点及び危険性を含む化学処理のキトサンに比して安全性の高い微生物処理キトサンである点等を考慮すれば、本薬剤を局部投与や静脈注射等によって投与することは十分可能である。

【0025】

【発明の効果】以上のように構成される本発明の薬剤は、ヒトの脳卒中の原病である高血圧症の抑制を促し、同じく原病とされる動脈硬化等の要因である高脂血症等の改善作用を備えており、逆に脳卒中易発病体質の生体に対しては高血圧の抑制効果はないものの、高血圧に耐え得る体質を形成せしめる効果があることが明らかである。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の薬剤の製造方法を示すフローチャートである。

【図2】脳卒中易発病性ラット（SHRSP）薬剤投与したキトサン群と投与しない対照群の体重変化を示すグラフである。

【図3】SHRSPのキトサン群と対照群の血圧変化を示すグラフである。

【図4】通常のラット（SHR）のキトサン群と対照群の血圧変化を示すグラフである。

【図5】（A）～（D）はそれぞれSHRSPのキトサン群と対照群のトータルコレステロール（T. Ch）、中性脂肪（T. G）、HDL-コレステロール（HDL-Ch）、LDL-コレステロール（LDL-Ch）を示すグラフである。

【図6】死亡したSHRSPの脳の表面写真である。

【図7】死亡したSHRSPの腎臓のH・E染色像写真である。

【図8】（A）、（B）は死亡したSHRSPの対照群とキトサン群の胸部大動脈血管の弾性線維染色像写真である。

【表1】

高濃度低分子キトサン酢酸溶液試験表

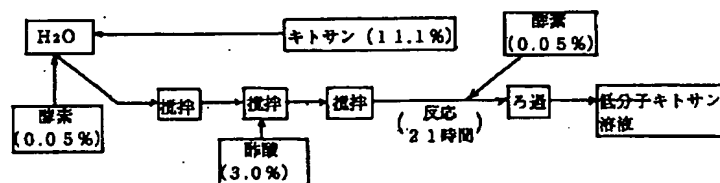
試験項目	試験値	備考
a) 水分	87.8%	105℃
b) 灰分	0.36%	550℃
c) 粘度	15.5 mpa.s	B型粘度計 20℃
d) 分子量	12400	ゲル濾過クロマトグラフ
e) 脱アセチル化度	80%	コロイド滴定法
f) PH	5.5	PHセンサー

【表2】

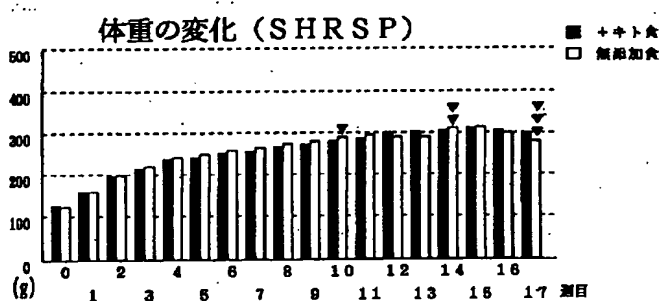
臓器重量（SHRSP）

項目	絶対重量（g）		相対重量（g/100gBW）	
	キトサン群	対照群	キトサン群	対照群
心臓	1.56±0.08	1.58±0.03	0.579±0.037	0.561±0.039
肝臓	11.6±1.51	12.3±0.48	4.135±0.313	4.142±0.160
腎臓	右 1.49±0.07	1.61±0.11	0.554±0.033	0.541±0.038
	左 1.49±0.05	1.51±0.13	0.560±0.041	0.509±0.044
脳	2.19±0.11	2.12±0.14	0.849±0.127	0.711±0.048
平均値±S.E. キトサン群 n=6 対照群 n=3				

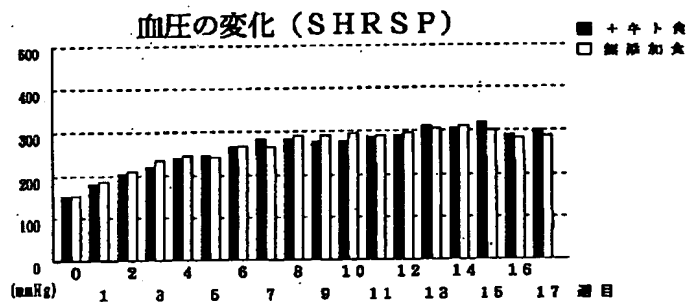
【図1】



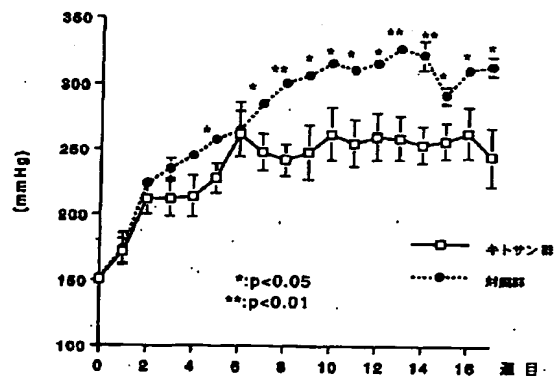
【図2】



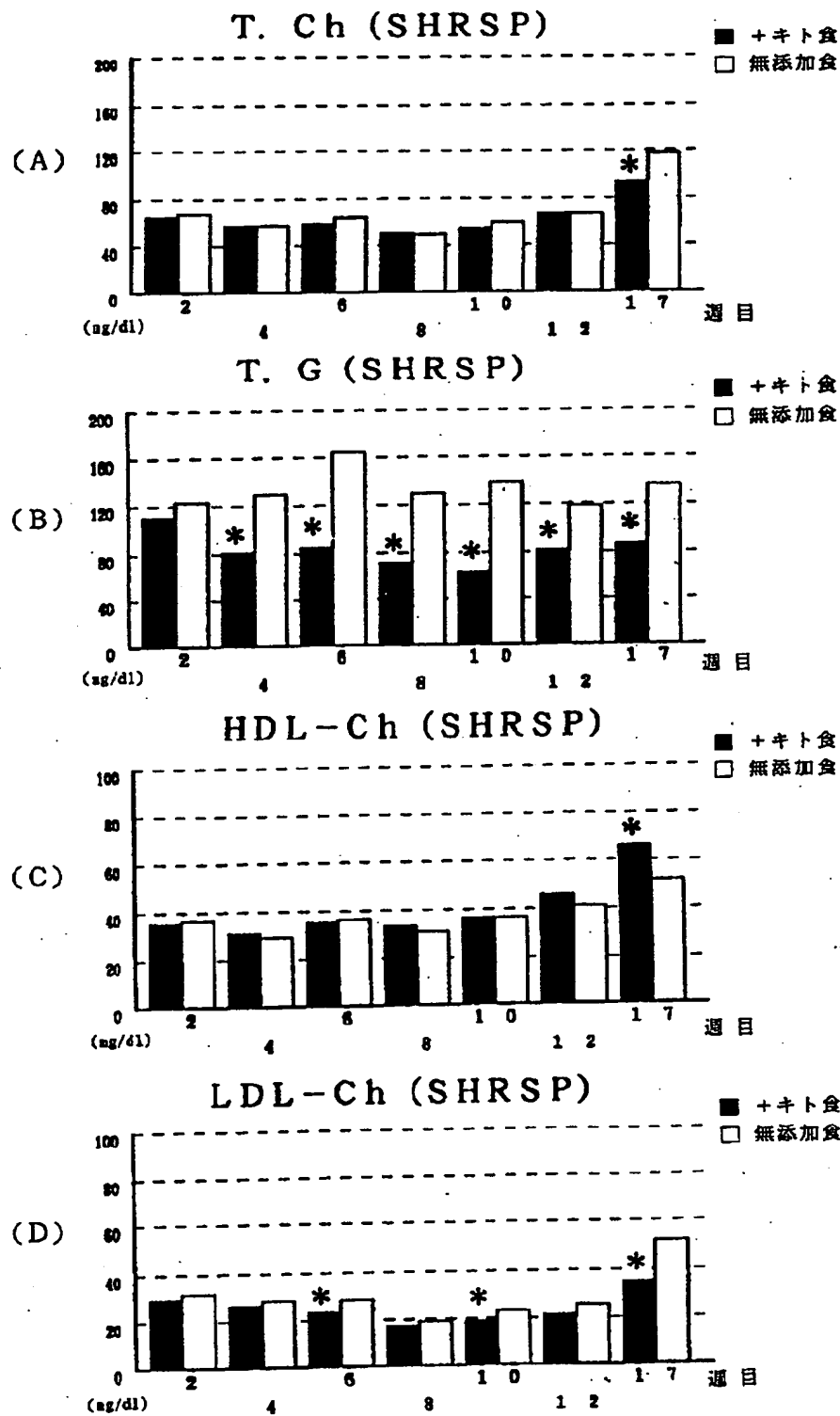
【図3】



【図4】



【図5】



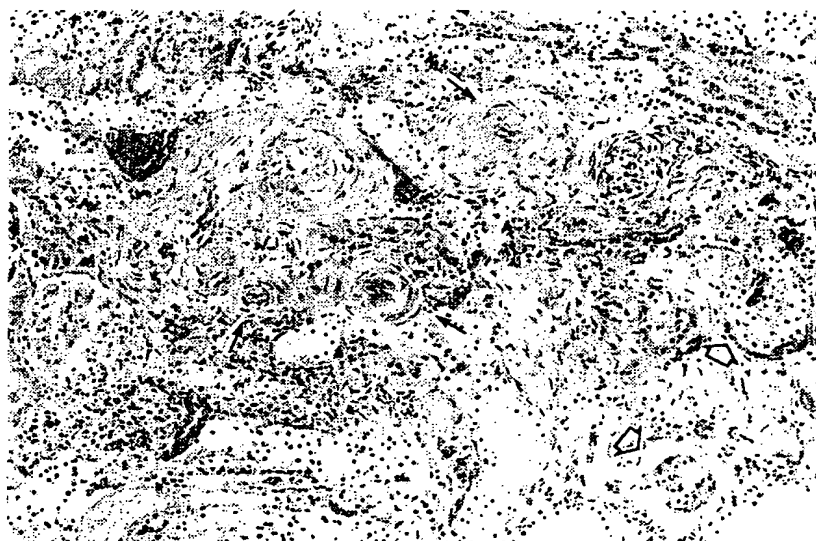
【図6】

図面代用写真



【図7】

図面代用写真

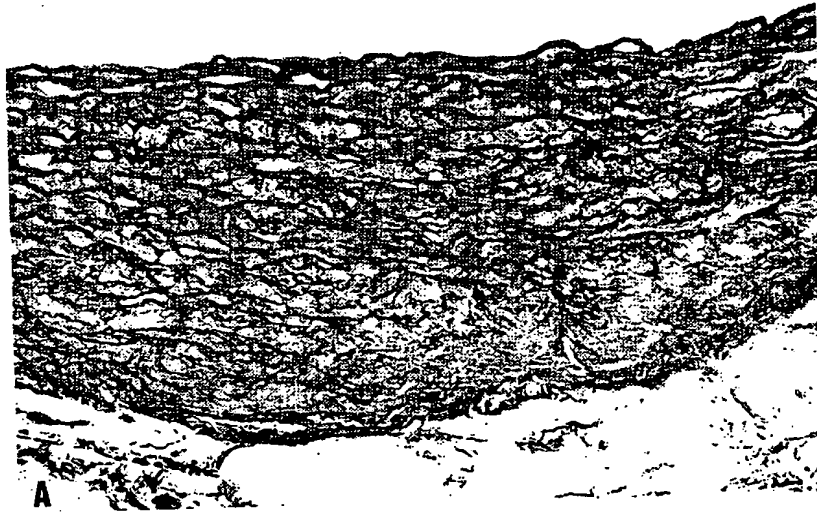




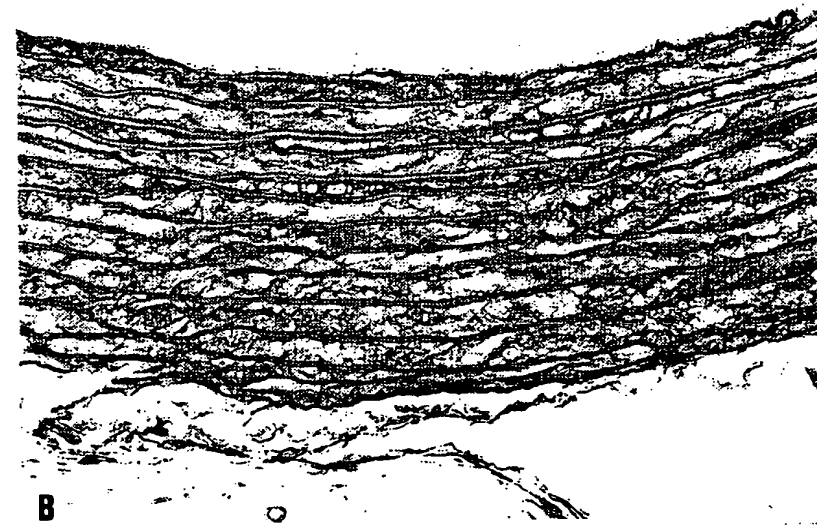
【図8】

図面代用写真

(A)



(B)



【手続補正書】

【提出日】平成9年3月18日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図2

【補正方法】変更

【補正内容】

【図2】脳卒中易発症性ラット（SHRSP）の薬剤投与したキトサン群と投与しない対照群の体重変化を示すグラフである。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】脳卒中易発症性ラットのキトサン群と対照群の  
血圧変化を示すグラフである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】死亡した脳卒中易発症性ラットの脳梗塞の発生  
現象を示す脳の表面写真である。

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図6

【補正方法】変更

【補正内容】

【図6】

図面代用写真



【手続補正書】

【提出日】平成9年3月18日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正内容】

【図7】死亡した脳卒中易発症性ラットの腎臓のH・E  
染色像の顕微鏡写真である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図8

【補正方法】変更

【補正内容】

【図8】(A), (B)は死亡した脳卒中易発症性ラッ  
トの対照群とキトサン群における胸部大動脈血管の弾性  
線維染色像の顕微鏡写真である。

【手続補正3】

【補正対象書類名】図面

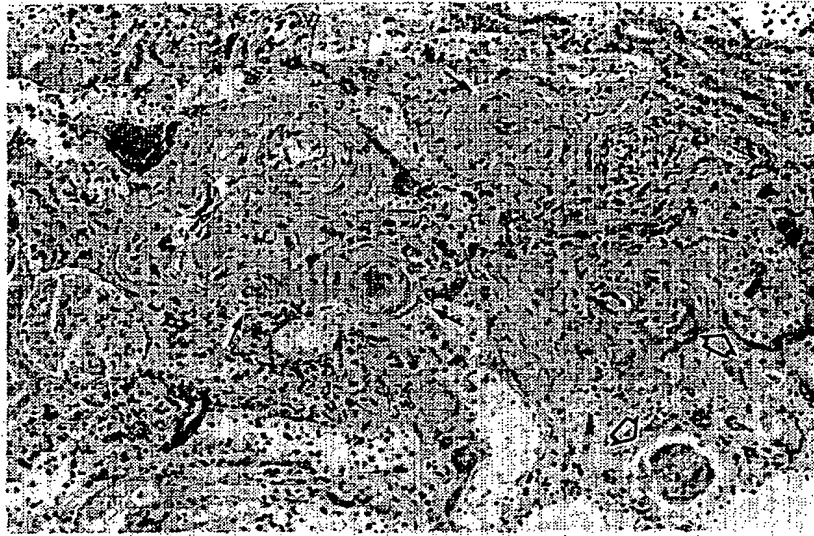
【補正対象項目名】図7

【補正方法】変更

【補正内容】

【図7】

図面代用写真

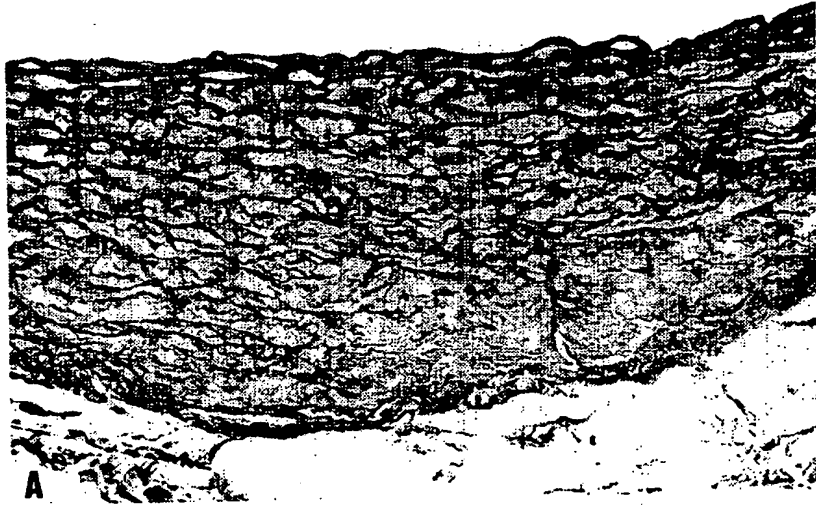


【手続補正4】  
【補正対象書類名】図面  
【補正対象項目名】図8

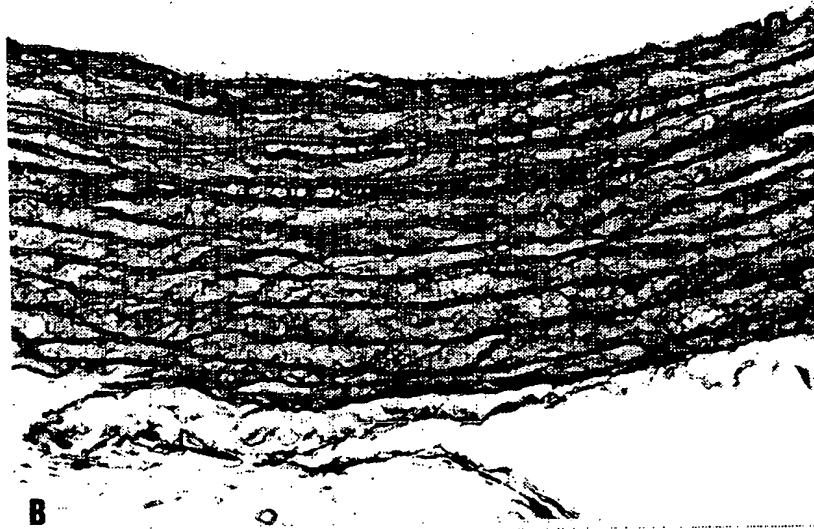
【補正方法】変更  
【補正内容】  
【図8】

図面代用写真

(A)



(B)



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**